

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

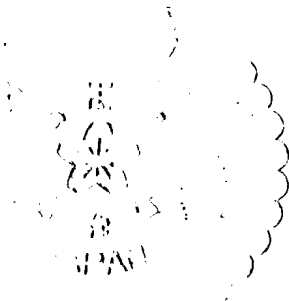
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 1 9 8 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 1 9 8 7]

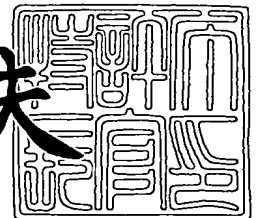
出 願 人 シスメックス株式会社
Applicant(s):



2 0 0 4 年 1 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 2 5 3 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03-1030

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/543
G01N 33/531

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 奥田 昌宏

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 棟尾 顕士

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100124453

【弁理士】

【氏名又は名称】 資延 由利子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗リン脂質抗体測定方法及び試薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 異好性阻止物質と抗リン脂質抗体との親和性を利用した抗リン脂質抗体測定方法。

【請求項 2】 抗リン脂質抗体がヒトループスアンチコアグulantである請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】 異好性阻止物質が、ヒト及びブタを除く哺乳類由来動物の抗体、血清及び／又は免疫グロブリンである請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 測定方法が凝固時間測定法である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の方法。

【請求項 5】 測定方法が免疫学的測定法である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の方法。

【請求項 6】 抗リン脂質抗体の測定が定量的である請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】 抗リン脂質抗体症候群の検査に利用される請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 に記載の方法。

【請求項 8】 異好阻止物質を含有する抗リン脂質抗体測定用試薬。

【請求項 9】 抗リン脂質抗体がヒトループスアンチコアグulantである請求項 8 に記載の測定用試薬。

【請求項 1 0】 異好阻止物質がヒト及びブタを除く哺乳類由来動物の抗体、血清及び／又は免疫グロブリンである請求項 8 又は 9 に記載の測定用試薬。

【請求項 1 1】 請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 に記載の測定用試薬を含む抗リン脂質抗体測定用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明が属する技術分野】

本発明は、抗リン脂質抗体、より詳しくは抗リン脂質抗体に属するループスアンチコアグulant（以下「L A」という）の測定法に関する。より詳しくは、特

異的反応吸収物質である異好性阻止物質と抗リン脂質抗体の親和性が、特異的かつ効率良いものであることを測定原理とした凝固時間測定法あるいは免疫学的測定法による抗リン脂質抗体の定量的測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

抗リン脂質抗体はカルジオリピン、ホスファチジルセリン、フォスファチジルリン酸などの陰性荷電をもった脂質に対する自己抗体の総称であり、代表的なものにはループスアンチコアグラントがある。これらのいずれかが陽性で、多彩な血栓症・流早産・血小板減少などの特有な臨床症状を示す疾患を抗リン脂質症候群 (antiphospholipid syndrome: APS) という。

【0003】

抗リン脂質抗体症候群の原因物質の一種である LA は不均一な抗体であり、陰性荷電リン脂質 (ホスファチジルセリン) かまたは $\beta 2$ -GPI をコファクターとするプロトロンビンに対する複合体の抗体であることが近年明らかになった。また、LA は個々の凝固因子活性を抑制することなく、リン脂質依存性の凝固反応を阻害する免疫グロブリンであることも知られている (臨床検査法提要, 金原出版, 改定第31版, 442頁)。ここでは、LA の診断基準として、(1) リン脂質依存性の凝固時間に延長が認められること、(2) 混合試験によりインヒビターの存在が認められること、(3) インヒビターがリン脂質依存性であること、(4) インヒビターが凝固因子に対して特異的でないことが示されている。

【0004】

LA の測定方法として、古くから凝固止血検査によるリン脂質依存性の検査方法が用いられてきた。例えば、ウサギ脳由来セファリン、ウシ脳由来セファリン、大豆レシチンなどを用い、高濃度のリン脂質と低濃度のリン脂質により調製された血漿活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 試薬で測定された凝固時間から Rosner Index や Lupus Ratio (LR) を換算することにより LA 陽性率を判定する手法が知られている。さらに血小板中和試験方法、トロンボプラスチン阻止試験 (TTI 法)、グラディポア LA (Gradipore 社; オーストラリア) というラッセル蛇毒 (dRVVT) 法やヘキサゴナルホシファチジルエタノールアミンを用いるスタクロ

ットLA法（ロッシュ社）がある。既存の研究報告によれば、V. Chantarangkulら（非特許文献1）やRosner E. ら（非特許文献2）がウサギ脳由来リン脂質などによるリン脂質濃度の差を利用して算術的にLAの検出を行っている。これらの方法はいずれもスクリーニングあるいは定性的な検査方法であり、抗リン脂質抗体あるいはループスアンチコアグラントを定量的に診断する方法ではなかった。また、免疫学的測定法である β 2GPI依存性抗カルジオリピン抗体測定法が開発されてきたが、この方法は直接的に抗リン脂質抗体あるいはループスアンチコアグラントに由来する免疫グロブリンを測定する方法ではなかった。

【0005】

抗リン脂質抗体症候群（APS）あるいはループスアンチコアグラント（LA）の検査方法として、ホシファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体を測定する方法（非特許文献3）が報告されてきたが、この方法は免疫学的測定法であるために凝固検査法で簡易にかつ定量的に測定することができなかった。

【0006】

国際血栓止血学会（ISTH）ではBrandtらがループスアンチコアグラントのガイドライン（非特許文献4）を作成し、抗リン脂質抗体症候群（APS）の診断のためのサッポロクライテリア（非特許文献5）を制定した。これらによれば、APSあるいはLAの診断は、1つの測定原理に基づく方法で行うのではなく、2又は3種の異なる測定原理を用いた検査方法を組み合わせることを勧告している。

【0007】

【先行文献】

【非特許文献1】

Thromb Res 1992;67:355-65

【非特許文献2】

Thromb Haemost 1987; 57: 144-4

【非特許文献3】

Arthritis Rheum 2000;43(9):1982-93

【非特許文献4】

Thromb Haemost 1995;74(4):1185-90

【非特許文献 5】

Arthritis Rheum 1999;42(7):1309-11

【0 0 0 8】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の解決すべき課題は、抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、具体的には L A の簡易かつ定量的な測定方法を提供することである。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、種々検討の結果、抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体を含む検体と特異的反応吸収物質である異好性阻止物質（マウス IgG、ウマ IgG、HBR、NMS、MAK33、マウス血清、ウマ血清などの、ヒト及びブタを除く哺乳動物由来の免疫グロブリン又は血清）を含む凝固時間測定用試薬又は免疫学的測定試薬を混合させると、異好性阻止物質の濃度依存的かつ特異的に、抗リン脂質抗体の吸収又は中和反応が起こることに着目し、鋭意研究を重ねた結果、凝固時間法又は免疫学的測定法によりヒトループスアンチコアグラント（ヒト L A）の確定診断を可能とすることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0 0 1 0】

すなわち本発明は、以下よりなる；

1. 異好性阻止物質と抗リン脂質抗体との親和性を利用した抗リン脂質抗体測定方法、
2. 抗リン脂質抗体がヒトループスアンチコアグラントである前項 1 に記載の測定方法、
- 3 異好性阻止物質が、ヒト及びブタを除く哺乳類由来動物の抗体、血清及び／又は免疫グロブリンである前項 1 又は 2 に記載の方法、
4. 測定方法が凝固時間測定法である前項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の方法、
5. 測定方法が免疫学的測定法である前項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の方法、
6. 抗リン脂質抗体の測定が定量的である前項 4 又は 5 に記載の方法、
7. 抗リン脂質抗体症候群の検査に利用される前項 1 ～ 6 のいずれか 1 に記載の方法、

8. 異好阻止物質を含有する抗リン脂質抗体測定用試薬、
9. 抗リン脂質抗体がヒトループスアンチコアグulantである前項8に記載の測定用試薬、
10. 異好阻止物質がヒト及びブタを除く哺乳類由来動物の抗体、血清及び／又は免疫グロブリンである前項8又は9に記載の測定用試薬、
11. 前項8～10のいずれか1に記載の測定用試薬を含む抗リン脂質抗体測定用試薬キット、からなる。

【0011】

【発明の実施の態様】

本発明の測定対象は、抗リン脂質抗体であり、具体的にはヒトループスアンチコアグulant（ヒトLA）である。LAはIgG、IgM、IgAクラスが存在する。本抗体を持つ者では、抗カルジオリピン抗体、抗 β 2グリコプロテイン抗体等の抗リン脂質抗体と同様に、臨床的に動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産血小板減少症等の抗リン脂質抗体症候群を呈する。

【0012】

LAの存在により、APTTをはじめとするリン脂質依存性の凝固時間延長が認められる。しかし、本発明の異好性阻止物質を凝固時間測定用試薬に添加しておくことで、凝固時間の延長が阻止されることが確認された。このことから、異好性阻止物質を含む試薬及び含まない試薬で検体を測定した場合に、例えばAPTTの差異を確認することにより、LAの存在の有無を確認することができる。

【0013】

異好性阻止物質とは、通常は異好性抗体による干渉を抑制することを目的として検査系に使用する物質をいい、本発明における異好性阻止物質の例としてヒト及びブタを除く哺乳動物由来の抗体、血清、免疫グロブリン等をいう。具体的にはマウスIgG、ウマIgG、ウシIgG、マウス血清、ウマ血清、ウシ血清、マウス、ウマ又はウシの α -グロブリンなどから選ばれる物質であり、より具体的にはHBR、NMS、MAK33などが挙げられる。例えば、異好性抗体による干渉を抑制することを目的とした異好性阻止試薬として市販されているHBR(Human anti-Mouse Antibodies Blocking Reagent: Scantibodies社製)や、MAK33(ロッシュ社製)な

どが適用される。

【0014】

本発明において、異好性阻止物質は、測定系において検体中に含有する LA と接触可能な態様で 사용할 ことができる。例えば、異好性阻止物質は、予め凝固検査試薬若しくは免疫測定試薬に混合することができる。又は検体と正常血漿の混合試験で使用する正常ヒト血漿に、各種濃度の異好性阻止物質を添加して使用することができる。添加する異好性阻止物質の量は、1 テスト（サンプル量 10～20 μ l）当たり 5～100 μ g、好ましくは 10～50 μ g を含ませることができる。異好性阻止物質は、1 種類又は 2 種類を混合して使用することができる。

【0015】

測定条件は、検体と異好性阻止物質との混合操作により、選択的に含有するヒト LA が異好性阻止物質に吸収される条件下で行うことができる。例えば、ヒト LA の吸収のために必要な時間は 1～30 分、好ましくは 2～10 分、より好ましくは約 5 分程度であり、好適な pH は 6～8 であり、好適な温度は 30～40℃であり、塩濃度は 1～500mM の条件である。

【0016】

LA 測定値は、異好性阻止物質を測定用試薬若しくは混合試験用の正常ヒト血漿に添加したもの及び添加していないものの 2 種類の組成により得られた測定用試薬若しくは正常ヒト血漿を用いて得た検査結果の比率、即ち次式に示す阻害比率を換算することにより得ることができる。

【0017】

阻害比率 = $1 - (\text{HBR 添加試薬} - \text{HBR 無添加試薬}) / \text{HBR 添加試薬}$

【0018】

また、免疫測定試薬では、異好性阻止物質を固相化しておき、これに検体を接触させ、洗浄後標識化異好性阻止物質を反応させて定量的に LA の測定も可能となる。固相としては、例えば、マイクロタイタープレートやポリスチレンビーズなどがあげられ、固相に固定する異好性阻止物質を緩衝液に溶解し、これを固相に接触させて、4℃で一晩以上放置することにより、固相に異好性阻止物質を固定化することができる。このとき、固相に均一にコートされているとは限らな

いため、牛血清アルブミンをトリス緩衝液に溶解し、これを固相に接触させ、同様にしてコートしておくことが好ましい。標識には、例えば、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどの酵素や、蛍光発色物質、化学発光物質、アイソトープなどで標識したものが用いられる。

【0019】

免疫測定用試薬を用いて抗原濃度を測定する場合には、通常の1ステップ法及び2ステップ法などの手順に従って行えばよい。すなわち、1ステップ法では、異好性阻止物質を固定化した固相に検体と標識異好性阻止物質溶液を加え、インキュベートし（例えば、4～37℃で60分～1日間）、固相に捕捉されなかった標識異好性阻止物質を洗浄して取り除いた後、固相に捕捉された標識異好性阻止物質の量を測定する。また、2ステップ法では、異好性阻止物質を固定化した固相に検体を加えてインキュベートし（例えば、4～37℃で30分～2時間）、固相に捕捉されえなかった検体を取り除く。次に、標識異好性阻止物質溶液を加えて再びインキュベートし（例えば、4～37℃で30分～2時間）、固相に捕捉されなかった標識異好性阻止物質を洗浄して取り除いた後、固相に捕捉された標識異好性阻止物質の量を測定する。

【0020】

標識異好性阻止物質の量を測定する方法としては、酵素で標識した場合には酵素活性の測定により測定することができ、蛍光発色物質で標識した場合には蛍光光度計により測定することができ、化学発光物質で標識した場合には酵素を用いた化学発光により測定することができ、アイソトープで標識した場合には放射線測定装置を用いることにより測定することができる。例えば、アルカリホスファターゼで標識した場合にはp-ニトロフェニルホスフェートを、ペルオキシダーゼで標識した場合には2'-アジノービー（3'-エチルベンジルチアゾリンスルホン酸）を基質として用い、一定時間反応させて生成する生成物の吸収波長の吸光度を測定すればよい。

【0021】

本発明で使用する異好性阻止物質は、一種類でも十分であるが、2種類以上を混合して使用することを否定はしない。さらに、 α -グロブリンのような追加蛋

白質を添加することも否定しない。

【0022】

測定に付される検体は、血漿が一般的である。その他、一般的な血液凝固測定系で調製される血液由来物質が適用可能である。つまり、被検体より採血、またはヘパリン等の抗凝固剤を添加して採血して得た血液試料を、遠心分離などの常法に基づき成分分離して得られた血漿ないし血清成分である。また、測定法に起因する非特異的吸着を抑制し、より高精度の測定とするために、この血漿及び血清成分をさらに超遠心分離により分離して特定画分としてもよい。

【実施例】

以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0023】

【実施例1】

(試薬の調製方法)

エラグ酸溶液 (0.1mM) に50mM HEPESおよび25mM TRIS 緩衝液(pH7.35)を混合し、5 μ g/mlのホスファチジルセリン(PS)、20 μ g/mlのホスファチジルエタノールアミン(PE)および70 μ g/mlのホスファチジルコリン(PC)を混合した。この溶液に400 μ g/mlの濃度となるようにHBR(ヒト 抗マウス抗体 ブロッキング試薬: Scantibodies社製)を添加した試薬(A)及びHBR無添加の試薬(B)を調製した。

【0024】

(測定方法)

血漿検体 (50 μ g/ml) に上記の試薬(A)又は試薬(B)各50 μ g/mlを混合し、37℃で5分間加温し、25mmol/lの塩化カルシウム液 (50 μ g/ml) を添加して全自動血液凝固分析装置コアグレックス800 (島津製作所製) を用いて測定を各2回行なった。正常血漿としてコアグトロールN (シスメックス社製) を用いて、LA陽性患者血漿、ワーファリン投与患者血漿、ヘパリン投与患者血漿、第VIII因子欠乏患者血漿を測定試料とした。なお、これらの患者検体は、NIBSC、ジョージキングバイオメディカル社、グラディポア社、ADI社、サンフコ社などの市販品を購入した。

【0025】

(結果)

結果を下記表1に示した。LA血漿と記載したヒトLA含有血漿は、HBRの添加した場合は無添加の場合に比べて有意に凝固時間の短縮が認められ、ヒトLAが異好性阻止物質と選択的に結合し、吸収されたことが確認できた。一方、正常血漿、ヘパリン血漿、ワーファリン血漿、第VIII因子欠損血漿及び第IX因子欠損血漿については、HBR添加の有無による凝固時間の有意な違いは認められなかった。また、阻害比率も、LA血漿が他の検体と比べて有意に異なる値を示した。

このことより、抗リン脂質抗体であるLAを含む血漿に特異的に異好性阻止物質であるHBRが反応することが確認された。

【0026】

【表1】

検体	異好性阻止物質(HBR)		阻害比率
	無添加	添加	
正常血漿1	27.1	26.7	1.01
正常血漿2	29.1	28.8	1.01
正常血漿3	28.4	28.1	1.01
LA血漿1	47.6	38.1	1.25
LA血漿2	60.7	34.1	1.78
LA血漿3	83.5	37.5	2.23
LA血漿4	53.6	33.7	1.59
LA血漿5	66.2	36.7	1.80
ヘパリン血漿1	45.6	44.6	1.02
ヘパリン血漿2	70.2	71.2	0.99
ワーファリン血漿1	65.2	66.6	0.98
ワーファリン血漿2	43.7	44.1	0.99
第VIII因子欠損	80.3	81.2	0.99
第IX因子欠損	91.2	92.5	0.99

(単位:秒)

【0027】

【実施例2】

(試薬の調製方法)

LAに対して感度の高い市販APTT試薬、トロンボチェックAPTT-SLA (シスメッ

クス社製)を用いて試験をおこなった。正常血漿に0~500 μ g/mlとなるようにHBRを添加した。各検体と各濃度のHBRを添加した正常血漿を1:1になるように混合し、凝固時間を求めた。

【0028】

(測定方法)

実施例1と同様に全自動血液凝固分析装置コアグレックス800(島津製作所製)を用いて測定を各2回行なった。その結果を表2及び図1に示した。

その結果、ヒトLA含有血漿では、異好性阻止物質の濃度依存的に凝固時間の短縮が確認され、LAと異好性阻止物質の反応性が定量的に行われることが確認された。一方、正常血漿、ヘパリン血漿、ワーファリン血漿、第VIII因子欠損血漿及び第IX因子欠損血漿については、HBR添加濃度の違いによる凝固時間の有意な違いは認められなかった。

【0029】

【表2】

検体	HBR 濃度(μ g/テスト)					
	0	2	5	10	20	30
正常血漿1	27.2	26.9	26.5	26.1	26.1	26.1
正常血漿2	29.4	29.5	29.4	29.1	29.3	29.2
LA1	48.5	43.3	38.0	37.1	37.7	37.4
LA2	43.7	39.2	34.7	35.3	35.2	35.6
LA3	39.9	36.5	33.0	32.2	32.1	32.7
LA4	40.1	36.3	32.5	32.0	33.0	33.5
LA5	39.5	36.4	33.3	32.5	29.6	28.8
ヘパリン1	34.2	33.8	33.4	33.3	33.0	33.6
ヘパリン1	45.2	44.6	45.1	44.8	45.1	45.0
ワーファリン1	42.1	41.9	42.0	42.1	42.1	42.0
ワーファリン2	49.5	49.6	49.1	49.2	49.3	49.1
第VIII因子欠損	33.2	33.1	33.3	33.2	32.9	33.0
第IX因子欠損	31.3	30.9	30.5	30.3	30.3	30.2

(単位:秒)

【0030】

【実施例3】

実施例2と同様に各濃度のHBRを添加しない試薬(0 μ g/テスト)と添加した試

葉 (2, 5, 10, 20, 30 μ g/テスト) を用いた場合の凝固時間の阻害比率を求めた。その結果、LA陽性検体でHBR濃度が5 μ g/テスト以上の場合に阻害比率が1.2以上を示した (表3)。

【0031】

【表3】

検体	HBR 濃度 (μ g/テスト)					
	0	2	5	10	20	30
正常血漿1	1.00	1.01	1.03	1.04	1.04	1.04
正常血漿2	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.01
LA1	1.00	1.12	<u>1.28</u>	<u>1.31</u>	<u>1.29</u>	<u>1.30</u>
LA2	1.00	1.11	<u>1.26</u>	<u>1.24</u>	<u>1.24</u>	<u>1.23</u>
LA3	1.00	1.09	<u>1.21</u>	<u>1.24</u>	<u>1.24</u>	<u>1.22</u>
LA4	1.00	1.10	<u>1.23</u>	<u>1.25</u>	<u>1.22</u>	<u>1.20</u>
LA5	1.00	1.09	<u>1.19</u>	<u>1.22</u>	<u>1.33</u>	<u>1.37</u>
ヘパリン1	1.00	1.01	1.02	1.03	1.04	1.02
ヘパリン1	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.00
ワーファリン1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ワーファリン2	1.00	1.00	1.01	1.01	1.00	1.01
第Ⅷ因子欠損	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01	1.01
第Ⅸ因子欠損	1.00	1.01	1.03	1.03	1.03	1.04

(阻害比率)

【0032】

【実施例4】

ヒトを除く哺乳動物由来異好性阻止物質のヒトLAに対する吸収効果を確認した。実施例2のHBRの代わりに、各種動物血清を一定割合で混合した (5倍希釈血清と2mg/mlの異好性阻止物質を9:1で混合して使用した)。

その結果を表4及び図2に示した。ヒトLA含有血漿の凝固時間は、異好性阻止物質が無添加の場合には63.6秒であり、HBRを添加した場合は45.3秒であったのに対して、牛由来血清 (GIBCO 38N2351) 添加の場合で45.9秒 (阻害比率1.36)、トリ由来血清 (35K3466カラム精製) 添加の場合で63.6秒 (阻害比率10.4)、マウス由来血清 (1910DM) 添加の場合で44.8秒 (阻害比率1.52)、馬血清 (9M0644) 添加の場合で44.2秒 (阻害比率1.62) となった。このことより、ヒトを除く哺乳動物由来血清のLA阻害効果が確認されたが、トリ由来血清ではほとん

ど効果は認められなかった。

【0033】

【表4】

検体	対照	動物血清									HBR
		ウシ	トリ	ウサギ	ブタ	ヒツジ	マウス	ウシ胎児	ウマ	ヤギ	
正常試料	26.0	26.3	27.0	26.4	29.2	26.8	27.8	26.0	27.4	26.8	26.3
LA陽性患者1	52.0	41.3	55.5	53.0	57.6	50.5	44.1	49.5	49.9	50.5	42.1
LA陽性患者2	63.6	45.9	63.6	56.0	67.4	56.4	44.8	57.8	47.3	56.2	45.3

(単位:凝固時間)

阻害比率

検体	対照	動物血清									HBR
		ウシ	トリ	ウサギ	ブタ	ヒツジ	マウス	ウシ胎児	ウマ	ヤギ	
LA陽性患者1	1.00	1.27	0.97	1.00	1.01	1.06	1.26	1.05	1.10	1.06	1.25
LA陽性患者2	1.00	1.40	1.04	1.15	1.06	1.16	1.52	1.10	1.42	1.17	1.42

【0034】

【実施例5】

異好性阻止物質を用いた免疫学的測定方法

(ELISAの系による抗LA抗体IgGの測定法)

HBR(ヒト 抗マウス抗体 ブロッキング試薬:Scantibodies社製)を0.1%NaN₃・0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)で20 μ g/mLに希釈し、100 μ L/wellを96穴のマイクロプレートの各ウェルに添加し、冷蔵一夜感作した。その後、洗浄液(0.05%Tween20・PBS(pH7.0))で洗浄し、1%BSA含有した50mM PBS(pH7.4)によりブロッキングした。マウスIgG感作プレートに1%BSAを含有した50mM PBS(pH7.4)で20倍に希釈した抗リン脂質抗体症候群(APS)患者又はループスアンチコアグラント(LA)陽性患者血漿を100 μ L添加し、室温30分で反応させ、その後洗浄液で洗浄した。マイクロプレートに感作した同一クローンのIgGのビオチン標識抗体(0.1 μ g/mL)を加え、更に室温で30分反応させた。ウェルを洗浄液で洗浄した後ストレプトアビジン標識POD(10mU/mL)100 μ Lを添加し、室温で30分反応させた。ウェルを再び洗浄液で洗浄し、0-フェニレンジアミン(OPD)基質液を加え、室温で15分反応後、反応停止液(2N硫酸)を100 μ Lを加え、吸光度(492nm/690nm)を測定した。

【0035】

その結果を下記表5に示した。ヒトLA含有血漿では、吸光度が1.308～3.452を示したが、正常血漿、ヘパリン血漿、ワーファリン血漿、第VIII因子欠損血漿および第IX因子欠損血漿については、吸光度が0.084～0.403の範囲を示した。このことより、抗リン脂質抗体であるLAを含む血漿に特異的な異好性阻止物質であることが免疫学的測定法でも立証された。

【0036】

【表5】

検体	吸光度 Abs 490/690 nm
正常血漿1	0.043
正常血漿2	0.104
LA1	<u>1.813</u>
LA2	<u>3.452</u>
LA3	<u>2.896</u>
LA4	<u>1.308</u>
LA5	<u>2.558</u>
ヘパリン1	0.230
ヘパリン2	0.073
ワーファリン1	0.403
ワーファリン2	0.098
第VIII因子欠損血漿	0.112
第IX因子欠損血漿	0.329

【0037】

【発明の効果】

異好性阻止物質を添加しない試薬と添加した試薬を用いて測定するで、抗リン脂質抗体症候群（APS）又はループスアンチコアグラント（LA）に由来する免疫グロブリンが特異的に中和または吸収される度合いを定量的に検査結果として得ることができた。異好性阻止物質の添加によっても、ヘパリン、ワーファリン、凝固因子欠損患者の凝固時間に対する影響はほとんど認められず、APSあ

るいはLAに由来する免疫グロブリンだけを正確にかつ定量的に検出する測定方法を提供することができた。

【0038】

その結果、従来煩雑であった、抗リン脂質抗体、ループスアンチコアグラントの臨床検査をより簡便により確実に行うことができ、抗リン脂質症候群のよりの的確な検査手段を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

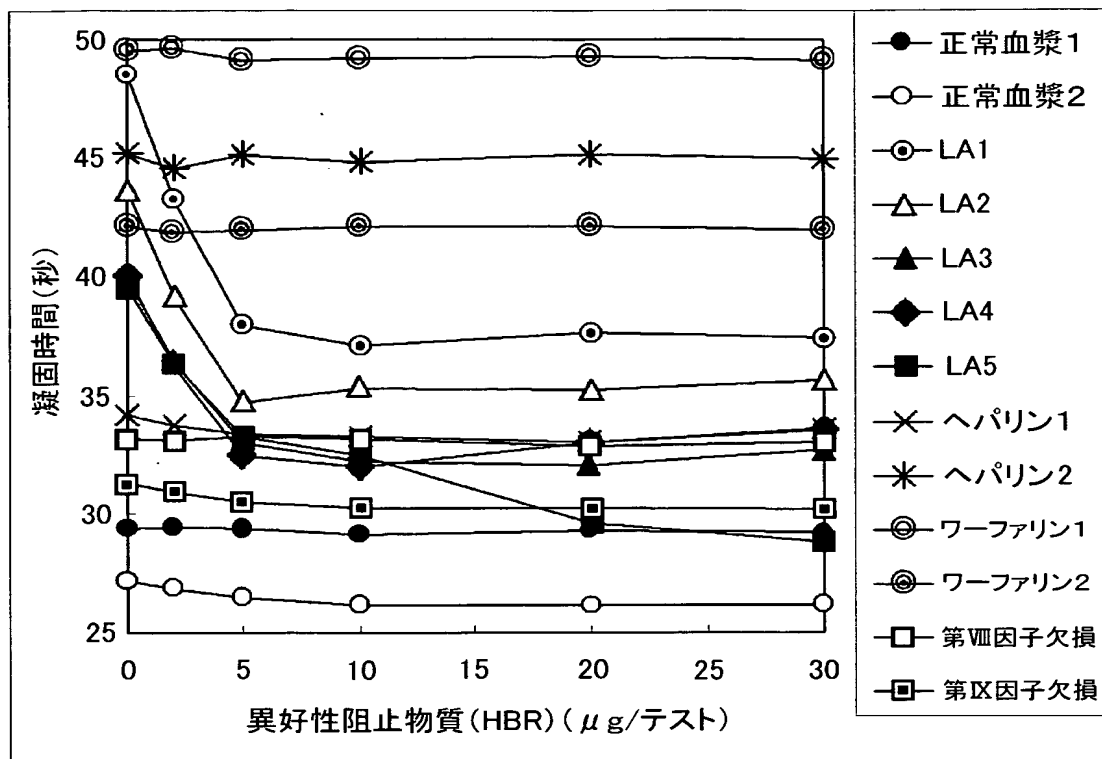
各濃度のHBRを添加した正常血漿と各検体を1：1で混合した場合の各検体の凝固時間を示す図である。（実施例2）

【図2】

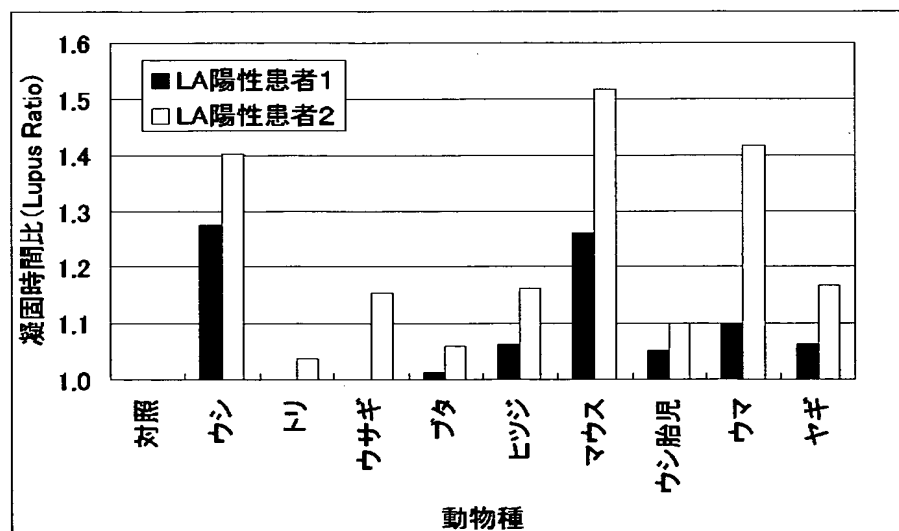
各種動物の血清を異好性阻止物質として凝固試薬に添加した試薬を使用して測定したときのLA血漿の阻害率を示す図である。（実施例4）

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、具体的にはループスアンチコアグラント（LA）を定量的かつ確定診断する簡易な測定方法を提供することである。

【課題手段】

抗リン脂質抗体症候群の原因物質である LA を含む検体と特異的反応吸収物質である異好性阻止物質（マウスIgG、ウマIgG、ウシIgG、マウス血清、ウマ血清、ウシ血清などの、ヒト及びブタを除く哺乳動物由来の免疫グロブリン又は血清、具体的にはHBR、NMS又はMAK33など）を含む凝固試薬又は免疫学的測定試薬を使用して凝固時間又は免疫学的測定を行うことによる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 9 1 9 8 7
受付番号	5 0 3 0 0 5 2 0 0 3 8
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 3 月 3 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 15 年 3 月 28 日

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 9 1 9 8 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 0 0 1 4 9 6 0]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 1 0 月 7 日

[変更理由] 名称変更

住所変更

住 所 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
氏 名 シスメックス株式会社